华氏巨球蛋白血症相关突变 *MYD88* L265P 新型检测体系的建立

陈弘远[1]，陈红岩[1]，乔纯[2]，李建勇[2]，卢大儒[1]

（1 复旦大学生命科学学院 上海 200438；2 南京医科大学第一附属医院，江苏省人民医院血液科，南京医科大学血液学重点实验室，肿瘤个体化医学协同创新中心 南京 210029 ）

摘要 华氏巨球蛋白血症（Waldenström' s macroglobulinemia, WM）是一种罕见的，不可治愈的淋巴浆细胞淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma, LPL）。*MYD88* L265P 突变在华氏巨球蛋白血症患者中检出率很高（>90%），可以用于疾病的鉴别和诊断，因此，开发一种高灵敏度的检测方法对这个突变进行检测具有较大的临床价值。通过将 ARMS 技术与 Clamping PCR 技术相结合，建立的新型 *MYD88* L265P 突变富集检测体系可以满足这一需求。优化后，该检测体系检出限为 10^2 拷贝，灵敏度为 0.1%，对 19 份临床样品的双盲试验中，检测结果准确率达到 100%。所建立的方法具有灵敏、准确的优势，适用于华氏巨球蛋白血症的早期诊断，有较为广阔的应用前景。

关键词 华氏巨球蛋白血症 *MYD88* L265P 突变 富集检测体系

The Establishment of a Novel Detection System for *MYD88* L265P in Waldenström' s Macroglobulinemia

Chen Hong-yuan[1], Chen Hong-yan[1], Qiao Chun[2], Li Jianyong[2], Lu Da-ru[1]

(1 School of Life Science, Fudan University, Shanghai, 200438, China, 2 Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Province Hospital; Key laboratory of Hematology of Nanjing Medical University: Collaborative Innovation Center for Cancer Personalized Medicine)

Abstract Waldenström's macroglobulinemia (WM) is a rare, incurable lymphoplasmacytic lymphoma (LPL). Research has showed that *MYD88* L265P is commonly detected in patients with WM (>90%). Therefore this mutation could be used as a biomarker for disease diagnosis and differentiation. Current detection methods used at this mutation are of low sensitivity, which limit the clinical utility for early diagnosis. Thus, there is an urgent need for a more sensitive method to fulfill the requirement of early diagnosis. By combining ARMS and Clamping PCR together, a novel detection system with higher sensitivity was developed. The limit of detection of the new system was 10^2 copies and the sensitivity was 0.1%. A double-blind trial with 19 clinical samples was conducted and the results completely accorded with the sample information. This new technique has a huge potential in clinical practices, especially early diagnosis, due to its increased accuracy and sensitivity.

Key words Waldenström's macroglobulinemia *MYD88* L265P mutation enrichment and detection system

世界卫生组织（WHO）将华氏巨球蛋白血症（Waldenström's macroglobulinemia，WM）定义为一种具有单克隆免疫球蛋白M（IgM）的淋巴浆细胞淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma，LPL）[1]。为研究该疾病潜在的突变，Treon等[2]对30例病人进行了全基因组测序，并在其中的27例样品中，发现了一个位于染色体3p22.2上位点38182641的一个胸腺嘧啶（T）变为胞嘧啶（C）的体细胞突变，随后使用Sanger测序法证明了这是髓样分化初级反应基因88（myeloid differentiation primary response 88，*MYD88*）上的L265P突变。

髓样分化因子88（myeloid differentiation factor 88，MYD88）是一种关键的衔接蛋白，它介导了Toll样受体（Toll-like receptor，TLR）和白介素-1受体（interleukin-1 receptor，IL-1R）的信号传导，从而激活核因子-κB（nuclear factor κB，NF-κB），参与人体的免疫反应[3-7]。*MYD88* L265P突变在华氏巨球蛋白血症患者中检出率很高（>90%）[8, 9]，而在其他惰性B细胞淋巴瘤中则较为罕见[10]，且近年来的研究表明，该突变与依鲁替尼（ibrutinib）用药疗效[11]及疾病预后[12]相关。因此其可以作为疾病诊断、用药和预后的依据。

由于*MYD88* L265P突变可以作为华氏巨球蛋白血症的生物标志物，因而发展合适的方法对这个突变进行检测有着非常重要的临床价值。但此突变为体细胞突变，仅存在于患者的肿瘤组织中，而正常组织中不存在[2]。因此，需要一个高灵敏度的检测方法，将极为少量的突变型靶序列从大量的野生型背景中富集出来并实现精确检测。然而，现有报道中的检测方法大都灵敏度较低，不能满足临床使用的需求。

目前有许多ARMS技术与Clamping PCR技术组合使用的尝试[13-16]，但在L265P突变的检测上尚未看到相关的报导。本课题受此启发，希望建立一个快速、简便且高灵敏度的新型检测体系，更好地实现对*MYD88* L265P低频突变的检测，便于早期诊断等的开展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

标准品质粒的构建，使用TaKaRa公司（日本）的pMD19-T Simple Victor试剂盒，转化和扩大培养使用实验室自制的DH5α感受态，使用Axygen公司（美国）

的AxyPrep质粒DNA小量试剂盒进行质粒抽提。qPCR使用的40×SYBR Green I 荧光染料购自Invitrogen公司（美国）。

1.1.2 主要仪器

标准品质粒测定浓度和质控使用 ND-2000 微量紫外可见分光光度计（Thermo Fisher Scientific，美国）。qPCR 反应在 Lightcycler Nano 实时定量 PCR 仪（Roche，瑞士）上进行。

1.1.3 样品

本研究共采集了 19 份临床 DNA 样本，在得到样品时无病人信息，仅有编号，用于进行双盲试验。样品由南京医科大学提供，采集于 2015 年 8 月 3 日至 2018 年 4 月 27 日，为骨髓或外周血样品，采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒（Qiagen，德国），按照说明书进行 DNA 抽提。样本信息中含有基本信息，如性别（13 例男性， 6 例女性）、年龄（36 至 76 岁，平均年龄 55.95 岁）、病理信息等。样品提供者均签署了知情同意书，操作符合科研伦理。样品 DNA 保存于-20℃冰箱中待用。

1.2 方法

1.2.1 标准品质粒的构建

构建标准品质粒时，以健康人基因组 DNA 为模板，扩增出片段后测序验证（上海杰李生物技术有限公司）。将野生型的片段连接到 pMD19-T 载体上，转化 DH5α 感受态，筛选单克隆扩大培养后，使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒进行质粒抽提，操作依照说明书进行。抽提的质粒用 ND-2000 微量紫外可见分光光度计测定浓度和质控，并进行测序验证，将正确的野生型质粒冻存备用。对于突变型质粒，采取重叠延伸 PCR 的方法进行构建。以测序验证的野生型基因组 DNA 为模板，应用所设计的四条引物扩增出两段在所需位点上为突变型且一端重叠的双链 DNA，再通过变性和退火，产生部分重叠的双链，经过第三轮 PCR，将末端补齐，形成突变型片段。将片段连接到载体上，按照与野生型质粒类似的步骤获得正确的突变型质粒并冻存。引物序列见表 1。

表 1 质粒构建引物序列

Table 1 Primers for standard plasmid construction

类型	标记	序列（5’-3’）
上游引物	MYD88-F	GGGATATGCTGAACTAAGTTGCCAC
下游引物	MYD88-R	GACGTGTCTGTGAAGTTGGCATCTC
内侧上游引物	MYD88-inF	GAAGCGACCGATCCCCATCAAG
内侧下游引物	MYD88-inR	TGGGGATCGGTCGCTTCTGATG

1.2.2 引物及阻抑子设计

本课题所采用的富集检测思路为：设计 ARMS 引物和一个覆盖突变位点的 Blocker，利用在突变位点上 ARMS 引物和 Blocker 形成竞争，在特定的温度下，ARMS 引物优先结合突变型模板而 Blocker 优先结合野生型模板，实现了对野生型模板更强的压制效果，通过 SYBR Green Ⅰ 染料检测是否有扩增产物生成，就可以判断样品中是否有突变型模板存在。原理图见图 1。

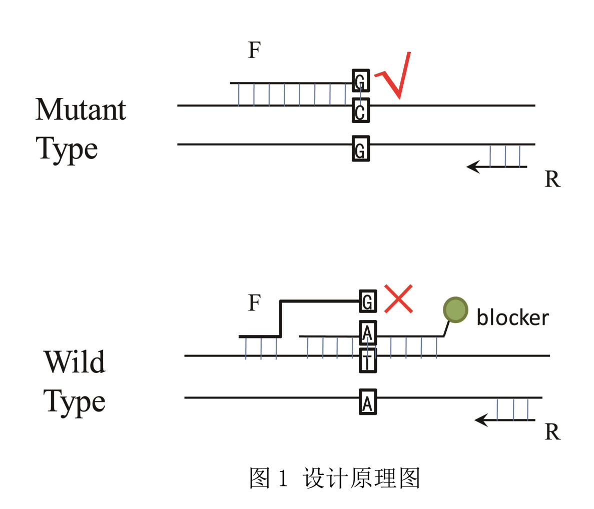


图 1 设计原理图

Fig.1 Schematic diagram

根据 GenBank 提供的序列信息，使用 Primer Premier 5 软件进行引物设计。下游引物为 ARMS 引物，3’末端位于突变点上，且符合引物设计的其他相关规律。使用的上游引物参考文献[4]。引物设计见表 2。

设计的 Blocker 与野生型模板完全匹配，末端采用氨基封闭。为了使 Blocker 在与引物竞争野生型模板时有优势，其与野生型模板的 Tm 值（65.0℃）高于引物与野生型模板的 Tm 值（59.2℃）。当模板为突变型时， Blocker 与其结合的 Tm 值（58.8℃）则低于引物结合的 Tm 值（63.3℃）。这样的设计使得引物更容易与突变型模板结合，而 Blocker 则倾向结合野生型模板。（见表 2）

表 2 引物和阻抑子序列

Table 2 Sequences of primers and blocker

类型	标记	序列（5’-3’）
通用上游引物	Common F	AATGTGTGCCAGGGGTACTTA
突变型特异性下游引物	MT-R	CCTTGTACTTGATGGGGATCG
阻抑子	Blocker	CATGGGGATCAGTCGCTTCTG-NH_2

1.2.3 反应体系与温度条件的优化

首先初步建立 qPCR 反应体系。对于扩增，两步法（即退火、延伸一步完成）

扩增可以保证在延伸过程中 Blocker 始终结合野生型模板并阻止其扩增，比传统三步法扩增更符合体系的要求。之后，对反应的温度、镁离子、酶、上下游引物和 Blocker 的用量进行系统的优化。

体系达到最优后，使用梯度稀释的质粒，对体系的检出限进行了考察。接着使用按比例混合的野生型和突变型质粒，对体系的灵敏度进行了考察。

1.2.4 样本双盲试验

在得到样品时，首先由一位与本研究无关的工作人员对样品进行随机编号，然后将仅有编号的样品交由我方进行检测。按照优化后的比例进行反应液的配制，在最适反应条件下进行样品检测。将检测结果发送给进行编号的工作人员，并请样品提供方将病人的测序结果也发送至此工作人员处，由其对结果进行核对。并将核对结果和病人信息反馈给我方。

2 结果

2.1 最终的反应体系及检出限

经过优化，最终的反应体系共 25 μL，以 PCR Buffer 为缓冲液，体系中包含 4.0 mM $MgSO_4$，0.025 mM dNTPs，上、下游引物各 0.05 μM，0.3 μM Blocker，0.625 μL SYBR Green 染料和 0.8U HaemoTaq，反应所需样本量为 1 μL。反应条件为 95℃预变性 600s，接着采用两步法扩增 45 个循环：95℃变性 15s，61.5℃退火、延伸 60s，扩增结束后，61.5℃保持 300s。然后采集熔解曲线以确定产物正确性，熔解程序为 95℃变性 60s，迅速冷却到 60℃并保持 60s，检测温度范围为 60~95℃，每秒升高 0.1℃并进行荧光采集。

按顺序加入梯度稀释（10^7 至 10^1 拷贝/μL）的突变型和野生型质粒以测试体系的检出限。从检出限考察结果来看（如图 2 所示），各浓度梯度下的突变型质粒的扩增曲线梯度良好；野生型质粒的扩增曲线中，除了 10^7 拷贝/μL 到 10^5 拷贝/μL 的扩增效果好于 10^2 拷贝/μL 的突变型外，其他浓度的野生型均扩增不佳，不会影响突变型结果的判读。综上，本体系的检出限为 10^2 拷贝/μL。

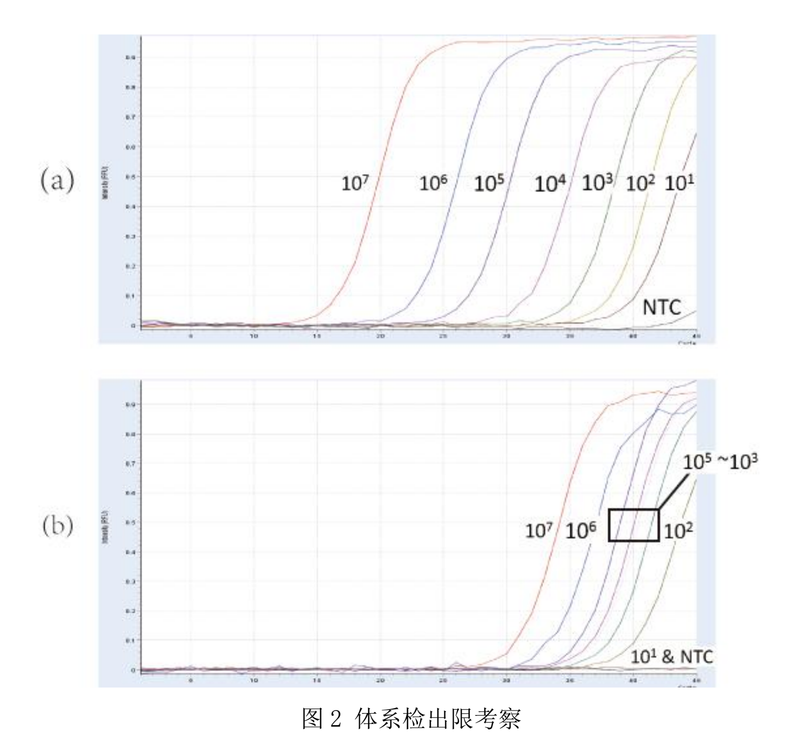


图 2 体系检出限考察

Fig.2 Limit of detection test

2.2 体系灵敏度

将突变型质粒按比例与健康人基因组混合（突变型占比从 100%到 0%），作为模板进行扩增，用以考察体系的灵敏度。灵敏度考察结果如图 3 所示。本体系可以将含有 0.1%突变型模板的混合质粒与野生型质粒区分开，灵敏度达到 0.1%。将多次试验中 0.1%突变型模板的 Cq 值统计后（ $\bar{X} - 2SD = 33.42$ ）作为野生型和突变型的区分值。

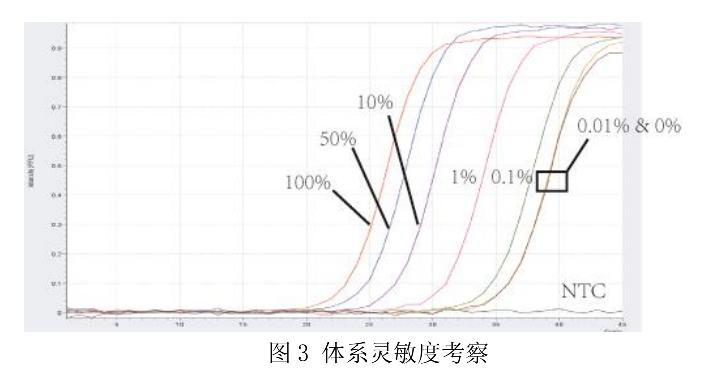


图 3 体系灵敏度考察

Fig.3 Sensitivity test

2.3 样本双盲试验

经过筛查，在 19 份样品中，共检出 14 份阳性样品和 5 份阴性样品，将体系检测结果交给进行编号的工作人员比对，结果显示检测结果与样品提供方提供的

信息完全符合。

3. 结果与讨论

随着生活水平的提高，人们对健康的关注程度也逐渐加深。而癌症等大部分疾病，如果能够在早期发现，往往对病人的治疗和预后都有很大的帮助。因此，针对疾病，尤其是癌症的早期诊断方法成为了近年的研究热点之一。但由于在疾病早期，非常少量的突变型 DNA 往往会被大量存在的野生型 DNA 掩盖，容易导致假阴性的结果。因此，这对检测体系的灵敏度提出了很高的要求。

华氏巨球蛋白血症容易发生误诊、漏诊[17]，*MYD88* L265P 突变作为生物标志物，对此病的早期诊断有较大的参考价值，针对这个位点的诊断方法也多有报道。目前用于 L265P 突变富集检测的最常见方法是 ARMS 技术，多个研究团队都报道了采用此方法对突变进行富集的检测效果，但采用的后续检测技术有所不同[4, 8, 18, 19]，其检测体系的灵敏度从 1.25%到 0.08%不等，证明基于 ARMS 技术建立 L265P 突变富集检测体系有一定的临床应用价值，但这些体系主要针对组织样品进行开发，在每个反应中加入的 DNA 量较大（50 到 500ng），增加了采样的难度；常见的 Clamping PCR 技术也被应用于 L265P 突变的富集，并采用测序作为后续的检测手段，但报道的灵敏度仅为 10-16.7%[20]，不适用于早期诊断；而直接采用 HRM 的方法对 L265P 突变进行分型检测，仅能实现 5%的灵敏度[21]，其应用也较为有限。

本体系最大的创新之处在于，将 ARMS 技术和 Clamping PCR 技术联合使用于 *MYD88* L265P 突变检测中，且检出限达到 10^2 拷贝/μL，灵敏度达到 0.1%。在临床样品的双盲试验中，本体系的准确性达到了 100%。相较于目前的报道，本体系更为灵敏准确，且只需通过一次 PCR 反应即可实现对样品的鉴定，对于反应仪器的要求较低；无需对 PCR 产物进行后处理，简化了操作步骤；体系基于 qPCR 平台且使用荧光染料，大大降低了检测成本。因此这个体系便于推广到基层医院，实现更大覆盖面的早期诊断，为患者提供便利。

另外，本研究中对突变型进行富集的设计思路也具有一定的推广价值，将 ARMS 技术与 Clamping PCR 技术联合使用，既存在 ARMS 引物对于突变型的特异性扩增，又实现了 Blocker 对于野生型的压制，“双管齐下”，提高了对野生型的抑制效果，更好的避免了这两种技术单独使用时容易产生假阳性的弊端。另外，其可与荧光探针技术等检测手段进行组合，实现多重的富集检测，从而提高体系

的检测通量。因此，此设计思路也可以为多位点富集检测体系的建立工作提供一个新的方向。

本实验还需改进的地方在于体系的稳定性。根据样品提供方提供的信息，样品中的突变频率在 0.79%到 47.06%之间。从最终检测结果的 Cq 值来看，突变频率为 0.79%的样品与阴性样品的 Cq 值较为接近，说明体系还不够稳定，仍有进一步优化和微调的空间。同时也希望能够进一步扩大样本量，并收集突变频率更低的样品，进一步验证体系的准确性和灵敏度。

[1] Gertz M A. Waldenstrom macroglobulinemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management[J]. Am J Hematol, 2012, 87(5): 503-510.

[2] Treon S P, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia[J]. N Engl J Med, 2012, 367(9): 826-833.

[3] Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, et al. High prevalence of the MYD88 mutation in testicular lymphoma: Immunohistochemical and genetic analyses[J]. Pathol Int, 2015, 65(10): 528-535.

[4] Xu L, Hunter Z R, Yang G, et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction[J]. Blood, 2013, 121(11): 2051-2058.

[5] Mori N, Ohwashi M, Yoshinaga K, et al. L265P Mutation of the MYD88 Gene Is Frequent in Waldenstrom's Macroglobulinemia and Its Absence in Myeloma[J]. PLoS One, 2013, 8(11).

[6] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. Nat Immunol, 2010, 11(5): 373-384.

[7] 焦国慧，代红胜，张灼寒, et al. MyD88aa155-171 功能区缺失对免疫相关细胞共刺激分子和细胞因子表达的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(9): 1-6.

[8] Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms[J]. Blood, 2013, 121(13): 2522-2528.

[9] Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas[J]. Leukemia, 2013, 27(1): 183-189.

[10] 孟琦，曹欣欣，李剑. MYD88^L265P 及 CXCR4^WHIM 基因突变在华氏巨球蛋白血症中的意义[J]. 中国医学科学院学报, 2017, 39(4): 578-582.

[11] Treon S P, Tripsas C K, Meid K, et al. Ibrutinib in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia[J]. New England Journal of Medicine, 2015, 372(15): 1430-1440.

[12] Treon S P, Cao Y, Xu L, et al. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia[J]. Blood, 2014, 123(18): 2791-2796.

[13] Myers M B, Mckinzie P B, Wang Y, et al. ACB-PCR quantification of somatic oncomutation[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1105: 345-363.

[14] Mckinzie P B, Parsons B L. Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific

competitive blocker PCR[J]. Mutation Research/genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis, 2002, 517(1–2): 209-220.

[15] Wang Y, Arlt V M, Roufosse C A, et al. ACB-PCR measurement of H-ras codon 61 CAA-->CTA mutation provides an early indication of aristolochic acid I carcinogenic effect in tumor target tissues[J]. Environ Mol Mutagen, 2012, 53(7): 495-504.

[16] Qu S, Liu L, Gan S, et al. Detection of low-level DNA mutation by ARMS-blocker-Tm PCR[J]. Clin Biochem, 2016, 49(3): 287-291.

[17] 李剑. 华氏巨球蛋白血症的诊治进展——"淋巴浆细胞淋巴瘤/华氏巨球蛋白血症诊断与治疗中国专家共识(2016 年版)"解读[J]. 临床血液学杂志, 2017, (5): 677-679.

[18] Staiger A M, Ott M M, Parmentier S, et al. Allele-specific PCR is a powerful tool for the detection of the MYD88 L265P mutation in diffuse large B cell lymphoma and decalcified bone marrow samples[J]. Br J Haematol, 2015, 171(1): 145-148.

[19] Capaldi I B, May A M, Schmitt-Graeff A, et al. Detection of MYD88 L265P mutations in formalin-fixed and decalcified BM biopsies from patients with lymphoplasmacytic lymphoma[J]. Exp Mol Pathol, 2014, 97(1): 57-65.

[20] Shin S Y, Lee S T, Kim H Y, et al. Detection of MYD88 L265P in patients with lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia and other B-cell non-Hodgkin lymphomas[J]. Blood Res, 2016, 51(3): 181-186.

[21] Wang C Z, Lin J, Qian J, et al. Development of high-resolution melting analysis for the detection of the MYD88 L265P mutation[J]. Clin Biochem, 2013, 46(4-5): 385-387.